

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①1 **DE 38 11 566 A 1**

②1 Aktenzeichen: P 38 11 566.2
②2 Anmeldetag: 6. 4. 88
④3 Offenlegungstag: 27. 10. 88

⑤1 Int. Cl. 4:
G 01 N 33/53

G 01 N 33/577
G 01 N 15/10
G 01 N 21/84
B 07 C 5/342
// (C12Q 1/00,
C12R 1:91)

DE 3811566 A1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
11.04.87 JP P 62-89153

⑦1 Anmelder:
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦4 Vertreter:
Bardehle, H., Dipl.-Ing.; Dost, W., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Altenburg, U., Dipl.-Phys.; Hoffmann, W.,
Dipl.-Phys.; Wallinger, M., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,
Pat.-Anwälte; Pagenberg, J., Dr.jur.; Frohwitter, B.,
Dipl.-Ing., Rechtsanwälte; Geißler, B.,
Dipl.-Phys.Dr.-jur., Pat.- u. Rechtsanwäl.; Kroher, J.,
Dr.; Kowal-Wolk, T., Dr.-jur., Rechtsanwälte, 8000
München

⑦2 Erfinder:
Imai, Kyoko, Katsuta, JP; Nomura, Yasushi, Mito, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Zellmessung

Mehrere Typen von zu testenden Zellen oder mehrere Typen von zu testenden Antigenen von Zellen lassen sich gleichzeitig auf einfache Weise mit hoher Empfindlichkeit nachweisen, indem man die Zellen oder Antigene mit mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umsetzt, wobei die Antikörper spezifisch mit den Zellen oder Antigenen reaktiv sind; und anschließend die Zellen oder Antigene durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist. Mehrere Typen von zu testenden Zellen oder mehrere Typen von zu testenden Antigenen von Zellen lassen sich auch nachweisen, indem man die Zellen oder Antigene mit Antikörpern, die jeweils spezifisch gegenüber den Zellen oder Antigenen reaktiv sind, umsetzt; anschließend damit Antikörper, die an mehreren Arten von optisch unterscheidbaren feinen Teilchen haften, umsetzt, wobei diese Antikörper spezifisch gegenüber den vorerwähnten Antikörpern reaktiv sind; und anschließend die Zellen oder Antigene durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

DE 3811566 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Zellmessung, bei dem zu testende Zellen in einer Probe durch Umsetzung mit für die Zellen spezifischen Antikörpern unterschieden werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

- mehrere Typen von zu testenden Zellen mit mehreren Typen von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umgesetzt, wobei die Antikörper jeweils spezifisch gegenüber den zu testenden Zellen reaktiv sind, und
- anschließend die mehreren Typen von zu testenden Zellen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Teilchen ausgewählt sind unter synthetischen polymeren Substanzen, Mikrokapseln und anorganischen Substanzen und einen Teilchendurchmesser von 10^{-10} bis 10^{-6} m aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den feinen Teilchen um Latexteilchen handelt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu testenden Zellen um Blutzellen handelt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutzellen ausgewählt sind unter Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Mikroskops nachgewiesen werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der die zu testenden Zellen enthaltenden Probe um einen Blutaussstrich oder ein Zytopräparat handelt.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und daß die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Fließzytometers nachgewiesen werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Formen und/oder Teilchendurchmesser sowie Farben der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung voneinander gestatten.

10. Verfahren zur Zellmessung, bei dem zu testende Zellen in einer Probe durch Umsetzung mit für die Zellen spezifischen Antikörpern unterschieden werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

- mehrere Typen von zu testenden Zellen mit mehreren Arten von Antikörpern, die spezifisch mit den zu testenden Zellen reaktiv sind, umgesetzt,
- anschließend Antikörper, die einzeln an mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen haften und die

mit den vorerwähnten Antikörpern spezifisch reaktiv sind, umgesetzt und

— anschließend die mehreren Typen von zu testenden Zellen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der Zellen ermöglicht, nachweist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Teilchen ausgewählt sind unter synthetischen polymeren Substanzen, Mikrokapseln und anorganischen Substanzen und einen Teilchendurchmesser von 10^{-10} bis 10^{-6} m aufweisen.

12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den feinen Teilchen um Latexteilchen handelt.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu testenden Zellen um Blutzellen handelt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutzellen ausgewählt sind unter Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Mikroskops nachgewiesen werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der die zu testenden Zellen enthaltenden Probe um einen Blutaussstrich oder ein Zytopräparat handelt.

17. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und daß die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Fließzytometers nachgewiesen werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Formen und/oder Teilchendurchmesser sowie Farben der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung voneinander gestatten.

19. Verfahren zur Zellmessung, bei dem zu testende Zellen in einer Probe durch Umsetzung mit für die Zellen spezifischen Antikörpern unterschieden werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

- mehrere Typen von Antigenen der zu testenden Zellen mit mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umgesetzt, wobei die Antikörper jeweils spezifisch gegenüber den zu testenden Zellen reaktiv sind,
- die mehreren Typen von Zellantigenen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der feinen Teilchen ermöglicht, unterscheidet und
- dabei die zu testenden Zellen nachweist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Typen von Antigenen auf der Oberfläche von ein und derselben zu testenden Zelle unterschieden werden, wobei die zu testende Zelle nachgewiesen wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, daß die feinen Teilchen ausgewählt sind unter synthetischen polymeren Substanzen, Mikrokapseln und anorganischen Substanzen und einen Teilchendurchmesser von 10^{-10} bis 10^{-6} m aufweisen.

22. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den feinen Teilchen um Latexteilchen handelt.

23. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Zellen um Blutzellen handelt.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutzellen ausgewählt sind unter Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen.

25. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die mehreren Typen von Antigenen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Mikroskops nachgewiesen werden.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der die zu testenden Zellen enthaltenden Probe um einen Blutausschlag oder ein Zytopräparat handelt.

27. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die mehreren Typen von Antigenen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Fließzytometers nachgewiesen werden.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß Formen und/oder Teilchendurchmesser sowie Farben der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung voneinander gestatten.

29. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Antikörpern um individuelle monoklonale Antikörper handelt.

30. Verfahren zur Zellmessung, bei dem zu testende Zellen in einer Probe durch Umsetzung mit für die Zellen spezifischen Antikörpern unterschieden werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

— mehrere Typen von Antigenen von zu testenden Zellen mit Antikörpern umsetzt, die spezifisch gegenüber den Antigenen reaktiv sind,

— anschließend damit Antikörper umsetzt, die an mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen haften, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber den vorerwähnten Antikörpern reaktiv sind,

— anschließend die mehreren Typen von Zellantigenen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, unterscheidet und

— dabei die zu testenden Zellen nachweist.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Typen von Antigenen auf der Oberfläche von ein und derselben zu testenden Zelle nachgewiesen wird.

32. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Teilchen ausgewählt sind unter synthetischen polymeren Substanzen, Mikrokapseln und anorganischen Substanzen und einen

Teilchendurchmesser von 10^{-10} bis 10^{-6} m aufweisen.

33. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den feinen Teilchen um Latexteilchen handelt.

34. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu testenden Zellen um Blutzellen handelt.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutzellen ausgewählt sind unter Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen.

36. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die mehreren Typen von Antigenen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Mikroskops nachgewiesen werden.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der die zu testenden Zellen enthaltenden Probe um einen Blutausschlag oder ein Zytopräparat handelt.

38. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und daß die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Fließzytometers nachgewiesen werden.

39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß Formen und/oder Teilchendurchmesser sowie Farben der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung voneinander gestatten.

40. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Antikörpern um individuelle monoklonale Antikörper handelt.

41. Verfahren zur Zellmessung, bei dem zu testende Zellen in einer Probe durch Umsetzung mit für die Zellen spezifischen Antikörpern unterschieden werden, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) einen Teil von mehreren Typen von zu testenden Zellen mit voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen individuelle Antikörper haften, umsetzt, wobei die Antikörper jeweils spezifisch gegenüber den zu testenden Zellen reaktiv sind,

(b) die restlichen zu testenden Zellen mit individuellen Antikörpern, die spezifisch gegenüber diesen zu testenden Zellen reaktiv sind, umsetzt, anschließend damit an feinen Teilchen haftende Antikörper umsetzt, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber den individuellen Antikörpern reaktiv sind und wobei die feinen Teilchen optisch von den in (a) erwähnten feinen Teilchen unterscheidbar sind, und

(c) die mehreren Arten von zu testenden Zellen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der individuellen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Teilchen ausgewählt sind unter synthetischen polymeren Substanzen, Mikrokapseln und anorganischen Substanzen und einen Teilchendurchmesser von 10^{-10} bis 10^{-6} m aufweisen.

43. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den feinen Teilchen um Latexteilchen handelt.
44. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu testenden Zellen um Blutzellen handelt.
45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutzellen ausgewählt sind unter Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen.
46. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Mikroskops nachgewiesen werden.
47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der die zu testenden Zellen enthaltenden Probe um einen Blutaussstrich oder ein Zytopräparat handelt.
48. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Parameter Farbe, Form und Teilchendurchmesser der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung gestattet und daß die zu testenden Zellen durch Unterscheiden der feinen Teilchen mittels eines Fließzytometers nachgewiesen werden.
49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß Formen und/oder Teilchendurchmesser sowie Farben der feinen Teilchen eine optische Unterscheidung voneinander gestatten.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zellmessung, insbesondere ein Verfahren zur Zellmessung, das sich zur Unterscheidung von mehreren Typen von Zellen oder mehreren Typen von Antigenen unter Verwendung eines Blutaussstrichs oder eines Zytopräparats oder zur Unterscheidung von mehreren Typen von Blutzellen oder Gewebezellen mittels eines Fließzytometers eignet.

Herkömmliche Immunoassays bedienen sich verschiedener analytischer Verfahren unter Anwendung von unterschiedlichen Markierungssubstanzen. Hierzu gehören beispielsweise Radioimmunoassays und Enzymimmunoassays. Viele dieser analytischen Verfahren werden zur Analyse von unterschiedlichen Komponenten in Blut angewandt. Diese analytischen Verfahren betreffen Substanzen, die an der sog. humoralen Immunität beteiligt sind. Andererseits wurden in letzter Zeit derartige hochempfindliche Immunoassaytechniken auf die Zellanalyse in Verbindung mit der sog. zellvermittelten Immunität angewandt, wobei Blutzellen, wie Lymphozyten und Erythrozyten, Gewebezellen und dergl., immunologisch untersucht werden. Beispielsweise gehören zu den Lymphozyten T-Zellen (T-Lymphozyten) und B-Zellen (B-Lymphozyten). Beide stammen von einer gemeinsamen schmalen Stammzelle ab. Sie wirken in Kooperation miteinander und verursachen in Kooperation mit Makrophagen, Monozyten, mehrkernigen Leukozyten und dergl. Immunoreaktionen. Bei verschiedenen immunologischen Erkrankungen stellt die Messung einer unnormalen Menge von T-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten Immunität spielen, oder von B-Zellen, die humorale Antikörper bilden, ein wertvolles Mittel für die Diagnose oder das

Verständnis der Pathologie dieser Krankheiten dar. Diese T-Zellen und B-Zellen werden derzeit auf folgende Weise gemessen. T-Zellen werden gemessen, indem man sich ihrer Eigenschaft zur Bildung einer Rosette mit Schaferythrozyten (SRBC) in einem Teströhrchen bedient oder indem man sie durch Membran-Fluoreszenzantikörper-Technik unter Verwendung eines spezifisch mit T-Zellen reaktiven Antikörpers (anti-T-Zell-Antikörper) färbt. B-Zellen werden gemessen, indem man sich ihrer Eigenschaft zur Bildung einer Rosette mit Mäuseerythrozyten (MRBC) in einem Teströhrchen bedient. Da T-Zellen Immunglobulin an ihrer Membranoberfläche aufweisen, besteht eine andere Methode zu ihrer Messung darin, daß man fluoreszierend markierte anti-human-Immunglobulinantikörper aufbringt und positive Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Nippon Rinsho (Japanese Clinic), Bd. 40 (1982), Special Fall Number, S. 985).

Jedoch sind bei den vorstehend beschriebenen Reaktionen unter Rosettenbildung zahlreiche aufwendige manuelle Arbeitsgänge erforderlich, z. B. eine Dichtezentrifugation. Außerdem besteht eine lange Wartezeit für die Rosettenbildung. Schließlich muß eine mikroskopische Untersuchung unter Verwendung einer Zellkammer durchgeführt werden. Somit erfordert die Messung von T-Zellen oder B-Zellen einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Demgegenüber kann die Membran-Fluoreszenzantikörper-Technik als ein zweckmäßiges Verfahren bezeichnet werden, bei dem sich aufgrund der Verwendung eines spezifischen Antikörpers eine hohe Präzision des Meßwertes ergibt. Jedoch ist dieses Verfahren insofern nachteilhaft, als die Nachweisempfindlichkeit relativ nieder ist, da die Menge an markierender Verbindung (fluoreszierende Substanz), die an ein Antikörpermolekül angebracht werden kann, beschränkt ist. Außerdem lassen sich nur bestimmte, begrenzte Arten von fluoreszierenden Substanzen als markierende Verbindungen verwenden. Die meisten von ihnen weisen ähnliche Fluoreszenzwellenlängen auf. Daher ist es schwierig, gleichzeitig eine optische Unterscheidung zwischen mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen unter Verwendung von mehreren Typen von fluoreszierenden Substanzen vorzunehmen.

Andererseits werden Enzymimmunoassay-Techniken zur Unterscheidung von Zellen oder Zellantigenen verwendet. Bei diesen Verfahren wird ein Antigen mit einem enzymmarkierten Antikörper umgesetzt, und anschließend wird eine enzymatische Reaktion unter Farbentwicklung durchgeführt. Ferner stehen Verfahren zur Verfügung, bei dem mehrere Typen von Farbstoffen mit ein und derselben Zelle in Kontakt gebracht werden, um eine Zellunterscheidung zu ermöglichen.

Jedoch sind diese Verfahren insofern nachteilhaft, als sich farbgebende Substanzen oder bei der Farbentwicklungsreaktion gebildete Materialien häufig lediglich an der Zelloberfläche abscheiden und daher die Gefahr besteht, daß sie nach dem Färben wieder entfernt werden. Außerdem kann nur eine beschränkte Anzahl von Enzymarten bei derartigen Verfahren eingesetzt werden, und es ist schwierig, zwischen mehreren Arten von Zellen oder Zellantigenen optisch auf der Basis der bei der enzymatischen Reaktion entwickelten Farbe zu unterscheiden. Außerdem sind mehrstufige Reaktionen für die Farbentwicklung erforderlich und die Wartezeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses ist lang.

In der JP-OS 1 32 870/86 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem mehrere Typen von Antikörpern individuell an Latexteilchen von unterschiedlichem Teilchen-

durchmesser haften. Unter Verwendung der Latexteilchen mit den daran haftenden individuellen Antikörpern und von mit einer fluoreszierenden Substanz markierten Antikörpern werden zu messende Immunglobuline durch Fließzytometrie nachgewiesen. Jedoch ist bei einem derartigen Verfahren die einsetzbare Menge an fluoreszierender Markierungssubstanz begrenzt, und es ist nicht möglich, mehrere Typen von Markierungssubstanzen zu verwenden, da nur eine Lichtquelle, die eine einzige Wellenlänge emittiert, eingesetzt werden kann. Außerdem muß neben dem optischen Detektor ein Detektor zur Erfassung der Verteilung der Latexteilchen eingesetzt werden. Daher ist es schwierig, ein derartiges Verfahren zum optischen Nachweis von mehreren Zelltypen anzuwenden.

Die JP-OS 45 454/82 beschreibt ein Verfahren, bei dem mehrere Typen von Antikörpern mit einer Mehrzahl von unterschiedlichen spektral sensibilisierenden photographischen Farbstoffen markiert werden, die markierten Antikörper mit mehreren Typen von zu messenden Antigenen (z. B. Peptiden) umgesetzt werden, die erhaltenen Reaktionsprodukte als Flecken auf eine ein Silberhalogenid enthaltende Schicht aufgebracht werden, die Reaktionsprodukte mit Licht von entsprechender spektral sensibilisierender Wellenlänge zur Durchführung einer Entwicklung belichtet wird, die Schwärzungsdichte des belichteten Bereichs gemessen wird und dabei die mehreren Typen von Antigenen nachgewiesen werden. Auch ein derartiges Verfahren ist kompliziert, so daß damit ein Nachweis von mehreren Typen von Zellen nicht einfach durchgeführt werden kann.

In den letzten Jahren wurde der Nachweis von Antigenen auf einer Zelloberfläche durch das Goldkolloid-Antikörper-Verfahren durchgeführt. Jedoch liegt die Wellenlänge der maximalen Absorption von Goldkolloid im Bereich von 520 bis 540 nm. Daher eignet sich das Goldkolloid-Antikörper-Verfahren nicht zur gleichzeitigen Unterscheidung von mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen.

Schließlich wurde in letzter Zeit versucht, ein Verfahren einzuführen, bei dem verschiedene Typen von Zellen klassifiziert werden, indem man sich in freier Weise der Mustererkennungstechnik auf der Basis der Eigenschaften von Zellen, wie Färbbarkeit und Form, bedient. Jedoch ist diese Zellklassifizierung unter Anwendung dieser Mustererkennungstechniken noch unzureichend in der Unterscheidungspräzision. Es besteht ein Bedürfnis zur Entwicklung eines Verfahrens zur Unterscheidung von Zellen, das mit hoher Spezifität abläuft.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Zellmessung bereitzustellen, das in einfacher und rascher Weise den Nachweis, die Unterscheidung und die Messung nicht nur von T-Zellen oder B-Zellen, sondern auch von mehreren Typen von Zellen, wie Blutzellen, Gewebezellen und dergl., oder von mehreren Typen von Zellantigenen ermöglicht.

Ein Weg zur Lösung dieser Aufgabe besteht darin, daß man mehrere Typen von zu testenden Zellen oder mehrere Typen von zu testenden Zellantigenen mit mehreren Typen von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen mit daran haftenden Antikörpern umsetzt, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber den Zellen oder Zellantigenen reaktiv sind, und anschließend die mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen gleichzeitig mit einer optischen Einrichtung, die ein Sortieren bzw. eine Zuordnung der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

Ein weiterer Weg zur Lösung der genannten Aufgabe besteht darin, daß man mehrere Typen von zu testenden Zellen oder mehrere Typen von zu testenden Zellantigenen mit Antikörpern, die spezifisch gegenüber den Zellen oder den Zellantigenen reaktiv sind, umsetzt; anschließend damit Antikörper, die individuell an mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen haften, umsetzt, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber den vorerwähnten Antikörpern reaktiv sind; und anschließend die mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen gleichzeitig mit einer optischen Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

Ein weiterer Weg zur Lösung der vorgenannten Aufgabe besteht darin, daß man

(a) einen Teil von mehreren Typen von zu testenden Zellen mit voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen individuelle Antikörper haften, umsetzt, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber diesen zu testenden Zellen reaktiv sind;

(b) die restlichen zu testenden Zellen mit individuellen Antikörpern, die spezifisch gegenüber diesen zu testenden Zellen reaktiv sind, umsetzt und anschließend damit Antikörper umsetzt, die an feinen Teilchen haften, die optisch von den in (a) genannten feinen Teilchen unterscheidbar sind, wobei diese Antikörper gegenüber den individuellen Antikörpern reaktiv sind; und

(c) die mehreren Typen von zu testenden Zellen durch eine optische Einrichtung, die ein Sortieren der einzelnen feinen Teilchen ermöglicht, nachweist.

Nachstehend wird die Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigt

Fig. 1 ein Diagramm zur Erläuterung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von mehreren Typen von Zellantigenen;

Fig. 2 ein Diagramm zur Erläuterung eines herkömmlichen Verfahrens zum Nachweis von mehreren Typen von Zellantigenen und

Fig. 3 ein Diagramm zur Erläuterung des Aufbaus eines Fließzytometers.

Die Art der erfindungsgemäß verwendeten feinen Teilchen ist nicht kritisch. Anders ausgedrückt, es können beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung beliebige feine Teilchen verwendet werden, sofern sie optisch nachweisbar sind. Beispiele für derartige feine Teilchen sind synthetische polymere Substanzen, wie Latexteilchen, beispielsweise aus Polystyrol und dergl.; Mikrokapseln, wie Liposomen und dergl.; anorganische Substanzen, z. B. Metallteilchen, wie Goldteilchen und dergl. Darunter werden Latexteilchen bevorzugt. Die Größe der feinen Teilchen beträgt 10^{-10} bis 10^{-6} m und vorzugsweise 10^{-7} bis 10^{-9} m. Eine derartige Größe eignet sich zur Unterscheidung von Zellen oder Zellantigenen. Was die Form der feinen Teilchen betrifft, können sie beispielsweise die Form von Kugeln, Würfeln, Sternen und dergl. aufweisen. Selbstverständlich besteht keine Beschränkung auf diese beispielhaft genannten Formen.

Mehrere Typen von Zellen oder mehrere Typen von Zellantigenen lassen sich gleichzeitig auf der Basis der unterschiedlichen Größe oder Form der feinen Teilchen messen, indem man den Teilchendurchmesser oder die Form der feinen Teilchen je nach den Typen der zu messenden Zellen oder Zellantigene variiert. Eine ande-

re Möglichkeit besteht darin, mehrere Typen von Zellen oder mehrere Typen von Zellantigenen gleichzeitig zu messen, indem man die Farbe der feinen Teilchen, die mit den Zellen oder Zellantigenen umgesetzt worden sind, nachweist, wenn die feinen Teilchen voneinander aufgrund einer Variation ihrer Farbe je nach den Typen von Zellen oder Zellantigenen unterscheidbar sind. In den letzten Jahren sind gefärbte Teilchen mit unterschiedlichen Teilchendurchmessern auf den Markt gekommen, die ebenfalls im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können. Ferner lassen sich Zellen oder Zellantigene mit hoher Empfindlichkeit nachweisen, indem man zwei oder mehr der Parameter Zelldurchmesser, Form und Farbe miteinander kombiniert.

Der Grund dafür, warum eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit mit den bisher allgemein üblichen Verfahren zur Markierung von Antikörpern nicht erreicht werden konnte, wird nachstehend anhand des Verfahrens unter Verwendung von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) einem typischen fluoreszierenden Farbstoff, und von anti-human-Albumin-Antikörper erläutert. Wird FITC zu einer gegebenen Menge an Antikörper gegeben, so läßt sich ein markierter Antikörper mit einem hohen Verhältnis von fluoreszierendem Farbstoff zu Proteineinheit (F/P) erhalten, indem man die Menge an FITC erhöht. Im allgemeinen wird häufig ein mit fluoreszierendem Farbstoff markierter Antikörper mit einem F/P-Wert von etwa 2 eingesetzt. Ein markierter Antikörper mit einem F/P-Verhältnis von etwa 3 läßt sich herstellen, jedoch ist in diesem Fall die Antikörperaktivität häufig verringert. Somit ist die effektive Anzahl von fluoreszierenden Molekülen pro Antikörpermolekül beschränkt. Es gibt zahlreiche Fälle, in denen nur 1 Molekül markierter Antikörper an 1 Molekül Zellantigen angebracht werden kann.

Daher ist es unmöglich, eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren unter Einsatz von optisch unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, eingesetzt. Selbstverständlich erlaubt dieses Verfahren den Nachweis von Zellen mit einer im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, bei denen der Antikörper selbst markiert wird, höheren Empfindlichkeit. Was die gleichzeitige Messung von mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen betrifft, so ist die Art der markierenden Substanzen, die bei herkömmlichen Verfahren eingesetzt werden können, z. B. fluoreszierende Farbstoffe für Fluoreszenzimmunoassays und Enzyme für Enzymimmunoassays beschränkt. Daher besteht auch hinsichtlich der Art von Zellen oder Zellantigenen, die auf der Basis der Art der markierenden Substanzen gleichzeitig voneinander unterschieden werden können, eine Beschränkung. Demgegenüber können im Fall der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten feinen Teilchen Teilchendurchmesser, Form oder Farbe je nach Wunsch ausgewählt oder untereinander kombiniert werden, und es können zahlreiche Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen eingesetzt werden. Somit läßt sich feststellen, daß das erfindungsgemäße Verfahren zur Zellmessung sich zur Unterscheidung und Messung von mehreren Typen von Zellen oder Zellantigenen eignet.

Außerdem ist beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung die bei herkömmlichen Verfahren erforderliche Farbbildungsreaktion nicht notwendig, was zu einer großen Zeit- und Arbeitersparnis für das Zellmessungsverfahren führt. Somit wird erfindungsgemäß ein rasches und einfaches Verfahren zur Zellmessung

bereitgestellt.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung können beliebige Blutzellen, Gewebezellen und dergl. gemessen werden. Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Meßverfahren zur Messung von Blutzellen, wie Lymphozyten, Leukozyten, Erythrozyten, Blutplättchen und dergl.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Zellmessung eignet sich insbesondere dann, wenn es sich bei der Testprobe um einen Blutausschlag oder ein Zytopräparat handelt. Durch entsprechende Wahl von Farbe, Form oder Teilchengröße der feinen Teilchen können die in Betracht kommenden Zellen oder die Anwesenheit von Antigen auf der Zelloberfläche ohne Beteiligung der Zellen nachgewiesen werden. Daher ist es auch möglich, verschiedene Zellen in einer Probe gleichzeitig auf der Basis der Form der Zellen oder auf der Basis der Information bei der Zellfärbung und dergl. zu klassifizieren, sowie die Anwesenheit des Antigens zu bestätigen. Für einen Nachweis von mehreren Typen von Zellen oder mehreren Typen von Zellantigenen war bei herkömmlichen Verfahren eine Mehrzahl von Präparaten von ein und derselben Probe erforderlich, während das erfindungsgemäße Verfahren die gleichzeitige Messung von mehreren Typen von Zellen oder mehreren Typen von Zellantigenen unter Verwendung von ein und demselben Präparat ermöglicht. Außerdem löst dieses Verfahren die Schwierigkeit, daß es bei einem der Farbbildung unterworfenen Farbstoff bei Mehrfachfärbung zu einer Entfärbung kommt.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung lassen sich die feinen Teilchen leicht unter Verwendung eines Mikroskops, z. B. eines optischen oder eines elektronischen Mikroskops, unterscheiden. Insbesondere lassen sich mehrere Typen von Zellen oder Zellantigenen leicht und exakt nachweisen, indem man einen Blutausschlag oder ein Zytopräparat als Testprobe einsetzt und die feinen Teilchen unter Verwendung eines Mikroskops unterscheidet.

Werden Teilchen, die sich in bezug auf Farbe und/oder Durchmesser und/oder Form voneinander unterscheiden, als feine Teilchen eingesetzt, so lassen sich diese exakt mittels eines Fließzytometers voneinander unterscheiden. In diesem Fall wird üblicherweise eine Zellsuspension als Probe eingesetzt.

Eine Zellsuspension wird beispielsweise hergestellt, indem man mehrere Typen von zu testenden Zellen mit mehreren Arten von feinen Teilchen, die sich in bezug auf Farbe und/oder Durchmesser und/oder Form voneinander unterscheiden und an denen Antikörper haften, umgesetzt werden, wobei die Antikörper jeweils spezifisch gegenüber den Zellen reaktiv sind. Anschließend wird die Zellsuspension in das in Fig. 3 gezeigte Fließzytometer eingeführt.

Werden mehrere Arten von feinen Teilchen, die sich in bezug auf die Farbe voneinander unterscheiden, verwendet, und wird die Unterscheidung aufgrund des Farbunterschieds vorgenommen, so ist es nach der Antigen-Antikörper-Reaktion erforderlich, nicht-umgesetzte feine Teilchen von der Zellsuspension, beispielsweise durch Zentrifugation, zu entfernen.

In Fig. 3 wird ein Strom von Zellen 1 in einer Kapillare 2 erzeugt und als Strom von Einzelzellen in eine Durchflußzelle 4 geleitet. Eine Lichtquelle 3 ist seitlich neben der Durchflußzelle angeordnet. Auf der anderen Seite der Durchflußzelle befindet sich ein Schlitz 5. Durch den Schlitz 5 tretendes Licht gelangt in einen Detektor 6. Aus dem Detektor 6 wird ein Signal in den

Signalprozessor 7 geleitet. Im Signalprozessor 7 erfolgt eine Aufarbeitung der Signale zum Nachweis und zur Unterscheidung der in Frage kommenden Zellen auf der Basis des absorbierten Lichtanteils oder des Fluoreszenzanteils.

Zu testende Zellen durchlaufen das enge Rohr (d. h. die Durchflußzelle) und werden aus der Lichtquelle 3 mit einem Laserstrahl bestrahlt. Ob es sich um die in Frage stehenden Zellen handelt oder nicht, kann bei der Laserbestrahlung aufgrund des Fluoreszenzanteils oder des Anteils an absorbiertem Licht beurteilt werden. Außerdem kann auch eine quantitative Bestimmung der Zellen vorgenommen werden. Es ist auch möglich, eine qualitative und quantitative Zellmessung aufgrund von Lichtstreuung durchzuführen. Eine Zellsortiervorrichtung, d. h. ein Zellsortiergerät, kann dem in Fig. 3 gezeigten automatischen Zellanalysator hinzugefügt werden. Die in Frage stehenden Zellen gelangen mit einem Wasserstrahl nach unten. Genau dann, wenn die Zellen die Stelle erreichen, wo der Wasserstrahl in Wassertropfchen übergeführt wird, wird dem Wasserstrahl eine positive oder negative Ladung verliehen. Sind die Zellen negativ geladen, so bewegen sich Wassertropfen mit einem Gehalt an diesen Zellen während des Durchlaufens eines elektrischen Hochspannungsfelds 8 in Richtung zu einer positiven Elektrode, so daß die Fallrichtung der Wassertropfen zur positiven Elektrode hin abgelenkt wird. Auf diese Weise lassen sich die in Frage stehenden Zellen in einem Probengefäß 9 sammeln.

Werden die zu testenden Zellen mit Hilfe eines Fließzytometers unter Verwendung von feinen Teilchen, die voneinander in bezug auf Teilchendurchmesser und/oder Form sowie in bezug auf die Farbe unterscheidbar sind, gemessen, so können neben Größe und Form der feinen Teilchen sowohl der Anteil der Lichtabsorption als auch der Lichtstreuung untersucht werden, so daß ein genauerer Nachweis der zu testenden Zellen möglich ist.

Selbstverständlich können feine Teilchen, die in bezug auf Farbe und/oder Durchmesser und/oder Form voneinander unterschiedlich sind, mit Hilfe eines Mikroskops unterschieden werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung werden mehrere Typen von zu testenden Zellen mit feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umgesetzt, wobei die Antikörper spezifisch gegenüber den Zellen reaktiv sind, und anschließend werden die feinen Teilchen mit Hilfe eines Mikroskops oder eines Fließzytometers voneinander unterschieden, wobei die zu testenden Zellen nachgewiesen werden können.

Eine andere Nachweismöglichkeit für zu testende Zellen besteht darin, daß man zunächst mehrere Typen von zu testenden Zellen mit Antikörpern, die spezifisch gegenüber den Zellen reaktiv sind, umgesetzt; anschließend das Reaktionsprodukt mit feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umgesetzt, wobei diese Antikörper spezifisch gegenüber den vorerwähnten Antikörpern reaktiv sind; und eine Unterscheidung der so umgesetzten feinen Teilchen vornimmt.

Eine weitere Nachweismöglichkeit für zu testende Zellen besteht in einer Kombination dieser Verfahren. Das heißt, zu testende Zellen lassen sich auch durch eine Kombination von feinen Teilchen, an denen Antikörper gegen die zu testenden Zellen haften, und anderen feinen Teilchen, an denen Antikörper gegen die genannten Antikörper haften, nachweisen.

Mehrere Typen von Antigenen auf der Zelloberfläche lassen sich ebenfalls auf die vorstehend beschriebene

Weise nachweisen, indem man feine Teilchen, an denen Antikörper haften, verwendet, wobei diese Antikörper mit den Antigenen reaktiv sind. Auch hier können diese Teilchen und andere feine Teilchen, an denen Antikörper haften, wobei diese Antikörper gegenüber den vorerwähnten Antikörpern spezifisch reaktiv sind, kombiniert werden. Dieser Nachweis ermöglicht die Beobachtung unter Mehrfachmarkierung von ein und derselben Zelle.

Beim vorerwähnten erfindungsgemäßen Verfahren werden als Antikörper, die gegenüber den Antigenen spezifisch reaktiv sind, vorzugsweise monoklonale Antikörper verwendet.

Blutzellen wurden bisher durch Mustererkennungstechniken mit Hilfe eines Computers auf der Basis verschiedener Informationen, z. B. Färbung, Form und dergl., klassifiziert. Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellmessung lassen sich Blutzellen klassifizieren, indem man die zu testenden Zellen mit mehreren Arten von optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umsetzt, wobei die Antikörper jeweils für die Zellen spezifisch sind, und die feinen Teilchen optisch nachweist.

Nachstehend werden ein herkömmlicher Enzymimmunoassay und das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem sich mehrere Typen von Zellantigenen nachweisen lassen, unter Beschreibung der aufeinanderfolgenden Reaktionsstufen erläutert. Beim herkömmlichen Verfahren, beispielsweise beim Nachweis von zwei Typen von Zellantigenen gemäß Fig. 2, d. h. eines Antigens 3 und eines Antigens 4 auf einer Zelle 2, die sich auf einem Objektträger 1 befindet, werden enzymmarkierte Antikörper hergestellt, indem man die Antigene 3 und 4 mit zwei Enzymen, die nach der Farbreaktion eine unterschiedliche Färbung ergeben, färbt. Das heißt, zunächst wird ein mit dem Enzym A markierter Antikörper mit dem Antigen 3 umgesetzt, wonach ein Substrat A zur Durchführung einer enzymatischen Reaktion zugesetzt wird. Das Antigen 3 wird durch Beobachten der gebildeten Farbe (d. h. rote Farbe 3') nachgewiesen. Anschließend wird das Antigen 4 nachgewiesen, indem man es mit Antikörper, der mit dem Enzym B markiert ist, umsetzt, anschließend das Substrat B zusetzt und die gebildete Farbe beobachtet (z. B. die blaue Farbe 4'). Beim beschriebenen herkömmlichen Verfahren besteht eine Beschränkung hinsichtlich der Enzymarten, so daß die Anzahl der Typen von Antigenen, die gleichzeitig nachgewiesen werden kann, ebenfalls beschränkt ist. Außerdem treten zusätzliche Schwierigkeiten auf, z. B. eine Entfärbung im Stadium nach der Färbung.

Bei dem in Fig. 1 gezeigten erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Probe auf einen Objektträger 1 mit optisch voneinander unterscheidbaren feinen Teilchen, an denen Antikörper haften, umgesetzt, wobei es sich um Antikörper gegen ein Antigen 3 und ein Antigen 4 auf der Oberfläche einer Zelle 3 in der Testprobe handelt (z. B. rote feine Teilchen mit einem daran haftenden Antikörper gegen das Antigen 3 und blaue feine Teilchen mit einem daran haftenden Antikörper gegen das Antigen 4).

Anschließend werden die einzelnen Teilchen voneinander mit Hilfe einer optischen Einrichtung, die ein Sortieren (Zuordnen) der einzelnen Teilchen ermöglicht, voneinander unterschieden, beispielsweise mit einem Spektroskop 5 durch ein optisches Mikroskop. Gemäß diesem Verfahren lassen sich das Antigen 3' und das Antigen 4 gleichzeitig nachweisen. Eine Ausführungsform der spektralen Eigenschaften der roten Teilchen

und der blauen Teilchen ist in Fig. 1 gezeigt.

Nachstehend wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Zellmessung anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Gleichzeitige Analyse von T-Zellen und B-Zellen

Ein Dünnschichtausstrich von Blut eines Patienten wird hergestellt, getrocknet und sofort fixiert. Der fixierte Blutausschlag wird 30 Minuten bei 37°C mit einem Reagens aus blauen feinen Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,03 µm, an denen anti-T-Zellen-Antikörper haften, und einem Reagens aus roten feinen Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,03 µm, an denen anti-B-Zellen-Antikörper haften, umgesetzt. Anschließend werden die Reaktionsprodukte ausreichend mit 0,1 m Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit einem Gehalt an 1% Humanserumalbumin gewaschen, und überschüssige Reagentien werden entfernt. Sodann werden die prozentualen Anteile an T-Zellen und B-Zellen bestimmt, indem man mittels eines optischen Mikroskops Zellen mit daran haftenden blauen feinen Latexteilchen und Zellen mit daran haftenden roten feinen Latexteilchen mißt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

	T-Zellen	B-Zellen
erfindungsgemäßes Verfahren	81%	19%
herkömmliches Verfahren	78%	22%

Die Ergebnisse in Tabelle I stimmen mit den Ergebnissen überein, die mit einem auf die gleiche Weise hergestellten und umgesetzten Blutausschlagpräparat erhalten werden, wobei man ein herkömmliches automatisches Hämatogramm-Sortiergerät zum Sortieren von Zellen mit daran haftenden roten Teilchen und Zellen mit daran haftenden blauen Teilchen verwendet und die prozentualen Anteile an T-Zellen und B-Zellen ermittelt.

Beispiel 2

Gleichzeitige Analyse von T-Zellen und B-Zellen

Ein Dünnschichtausstrich des Bluts eines Patienten wird hergestellt, getrocknet und sofort fixiert. Ein Reagens mit Mäuse-anti-T-Zellen-Antikörpern und ein Reagens mit Ratten-anti-B-Zellen-Antikörpern wird tropfenweise zum fixierten Blutausschlag gegeben. Die Umsetzung wird 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend werden die Reaktionsprodukte mit Phosphatpuffer mit einem Gehalt an 1% Albumin gewaschen. Anschließend werden ein Reagens von blauen feinen Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,03 µm, an denen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper haften, und ein Reagens von roten feinen Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,03 µm, an denen Kaninchen-anti-Ratten-Antikörper haften, tropfenweise zu den Reaktionsprodukten gegeben. Die Umsetzung wird 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Sodann werden die erhaltenen Produkte gewaschen, und die prozentualen Anteile an T-Zellen und B-Zellen werden

den bestimmt, indem man die Zellen mit daran haftenden blauen Teilchen und die Zellen mit daran haftenden roten Teilchen mit Hilfe eines optischen Mikroskops mißt. Die Ergebnisse stimmen gut mit den bei einem herkömmlichen Verfahren erhaltenen Ergebnissen überein.

Beispiel 3

Gleichzeitige Analyse von mehreren Typen von Zellantigenen

50 µl einer Suspension von Humanlymphozyten werden mit 50 µl eines Reagens von feinen roten Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,01 µm, an denen Human-Transferrin-Rezeptor-Antikörper haften, und 50 µl eines Reagens von blauen feinen Latexteilchen mit daran haftenden anti-human-T-Zellen-Antikörpern vermischt. Die Umsetzung wird 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Nach Hämolyse von kontaminierenden Erythrozyten werden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 300 g gewaschen. Die gewaschenen Zellen werden zu einem Präparat verarbeitet. Zellen, an denen sowohl rote Teilchen als auch blaue Teilchen haften, werden unter einem Mikroskop betrachtet, wobei aktivierte T-Zellen identifiziert werden.

Beispiel 4

Gleichzeitige Analyse von T-Zellen und B-Zellen

Ein Gemisch aus 20 µl einer Suspension von Humanlymphozyten und 10 µl Mäuse-anti-T-Zellen-Antikörper wird 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Zum Waschen der Zellen wird 2 mal 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Anschließend werden 20 µl eines Reagens von Goldteilchen mit einem Durchmesser von 30 nm, an denen Ziegen-anti-Maus-Antikörper haften, zum fertigen Präzipitat gegeben. Das erhaltene Gemisch wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 5minütigem Waschen durch Zentrifugation bei 800 g werden 50 µl eines Reagens von feinen gelben Latexteilchen mit einem Teilchendurchmesser von 0,8 µm, an denen Kaninchen-anti-B-Zellen-Antikörper haften, zu dem durch die Zentrifugation gebildeten Präzipitat gegeben. Die Reaktion wird 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach dem Waschen der Zellen wird eine Suspension der Zellen auf einen Objektträger getropft, ausgestrichen und fixiert. Das erhaltene Präparat wird unter einem optischen Mikroskop betrachtet. Es ist möglich, T-Zellen und B-Zellen in einer Lymphozytensuspension auf der Grundlage der Farbtöne der Zellen und des unterschiedlichen Teilchendurchmessers der gefärbten Teilchen zu unterscheiden.

Beispiel 5

Gleichzeitige Analyse von T-Zellen und B-Zellen mit Hilfe eines Fließzytometers

100 µl einer Lymphozytensuspension werden mit 50 µl eines Reagens von grün fluoreszierenden Latexteilchen mit daran haftenden anti-T-Zellen-Antikörpern und mit 50 µl eines Reagens von rot fluoreszierenden Latexteilchen mit daran haftenden Anti-B-Zellen-Antikörpern vermischt. Die Umsetzung wird 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wird 2 mal 10 Minuten durch Zentrifugation gewaschen. Das endgültige

Präzipitat wird mit einer Pufferlösung versetzt. Sodann wird die Analyse mit Hilfe eines Fließzytometers durchgeführt. In diesem Fall sind zwar 2 Arten von Lasern für die Bestrahlung erforderlich, da unterschiedlich gefärbte Latexteilchen verwendet werden, jedoch kann der Nachweis unter Verwendung von Lasern, wie sie üblicherweise bei Verfahren zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung von DNA und RNA verwendet werden, erfolgen.

In Tabelle II sind die prozentualen Anteile der Zellzahlen bei Bestimmung mittels Laserbestrahlung und durch Auszählen der Zellen ausgeführt.

Tabelle II

	T-Zellen	B-Zellen
erfindungsgemäßes Verfahren	79%	21%
herkömmliches Verfahren	76%	24%

Die Ergebnisse von Tabelle II werden erhalten, indem man die fluoreszierenden Latexteilchen in haftende Verbindung mit den in Frage stehenden Zellen bringt und die Messung mit Hilfe eines Fließzytometers durchführt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den gemäß einem herkömmlichen Verfahren erhaltenen Ergebnissen überein.

Beim herkömmlichen Verfahren werden die T-Zellen und B-Zellen jeweils gefärbt und anschließend mit Hilfe eines optischen Mikroskops gemessen.

Beispiel 6

Gleichzeitige Analyse von T-Zellen und B-Zellen unter Verwendung von Liposomen

Liposomen werden auf herkömmliche Weise hergestellt. In den Liposomen werden jeweils die lichtabsorbierenden Substanzen TAMSMB (2-(2-Thiazolyloxy)-4-methyl-5-sulfomethyl-aminobenzoessäure) und Amidoschwarz eingekapselt. Anti-T-Zellen-Antikörper und anti-B-Zellen-Antikörper werden auf herkömmliche Weise in haftende Verbindung mit den TAMSMB enthaltenden Liposomen bzw. mit den Amidoschwarz enthaltenden Liposomen gebracht. 100 µl einer Lymphozytensuspension werden mit jeweils 50 µl der Lösungen mit den markierten Antikörpern gebracht. Die Umsetzung wird 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wird 2mal durch 10minütiges Zentrifugieren gewaschen. Das endgültige Präzipitat wird mit einer Pufferlösung versetzt, wonach die Analyse mit Hilfe eines Fließzytometers durchgeführt wird. In diesem Fall lassen sich die lichtabsorbierenden Substanzen nachweisen, indem man die zu messenden Zellen mit weißem Licht belichtet und das durchtretende Licht in seine spektralen Komponenten auftrennt.

Die Anzahl der Signale bei den Wellenlängen 410 nm und 600 nm, die auf die in den Liposomen eingekapselten Substanzen zurückzuführen sind, wird ermittelt. Die prozentualen Anteile der Zellzahlen sind in Tabelle III angegeben.

Tabelle III

	T-Zellen	B-Zellen
erfindungsgemäßes Verfahren	81%	19%
herkömmliches Verfahren	76%	24%

Die Ergebnisse des herkömmlichen Verfahrens beziehen sich auf eine mikroskopische Untersuchung. Die erfindungsgemäßen Ergebnisse beziehen sich auf die Zellmessung unter Verwendung der lichtabsorbierenden Substanzen als Markierungssubstanzen. Die Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen des herkömmlichen Verfahrens überein.

Wie vorstehend erläutert, lassen sich erfindungsgemäß mehrere Typen von Zellen, wie Blutzellen, Gewebezellen und dergl., oder mehrere Typen von Zellantigenen gleichzeitig leicht und schnell mit hoher Empfindlichkeit unterscheiden und messen.

- Leerseite -

3811566

Nummer:
Int. Cl.4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

38 11 566
G 01 N 33/53
6. April 1988
27. Oktober 1988

FIG. 1

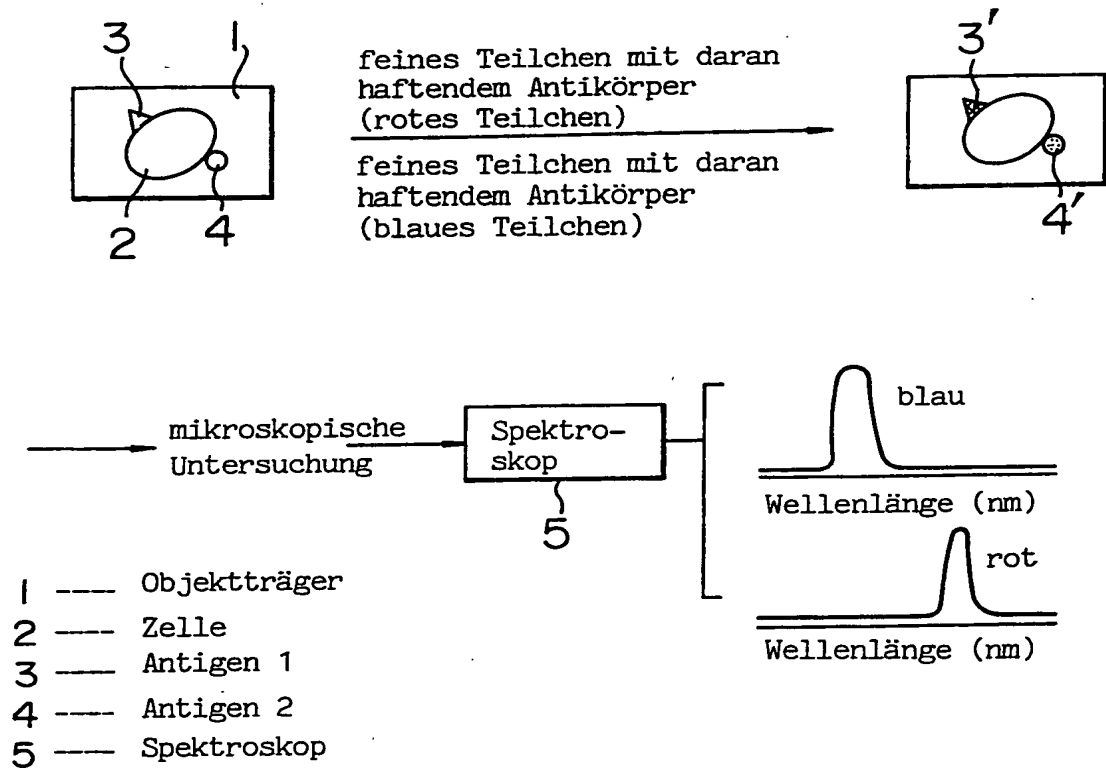
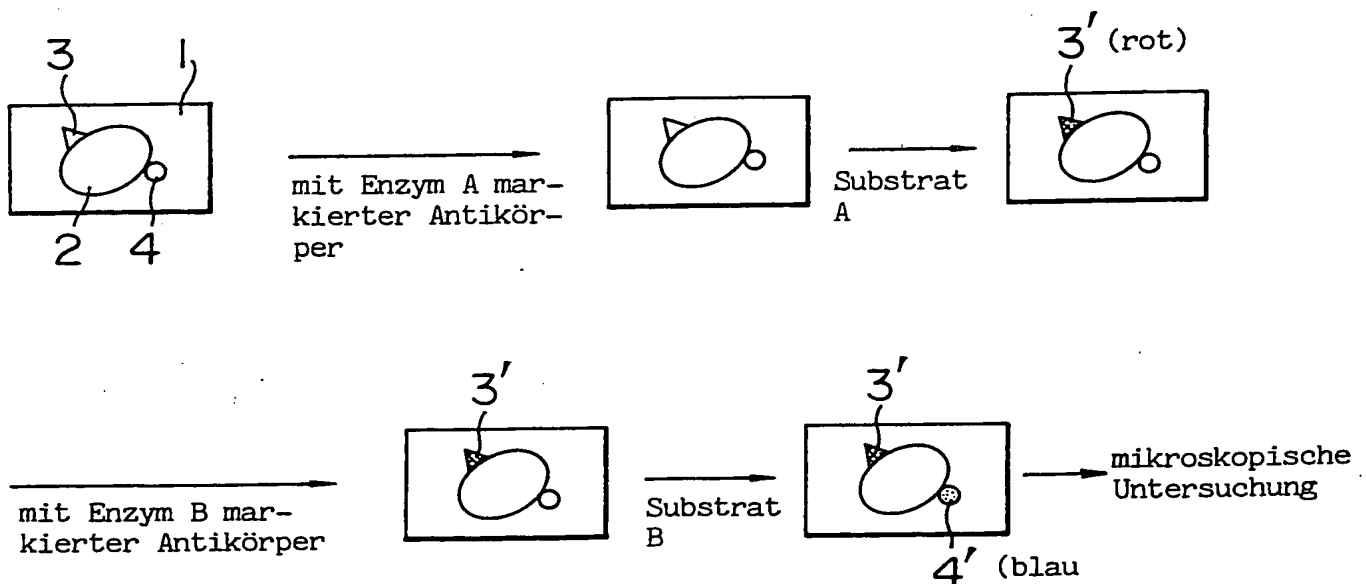


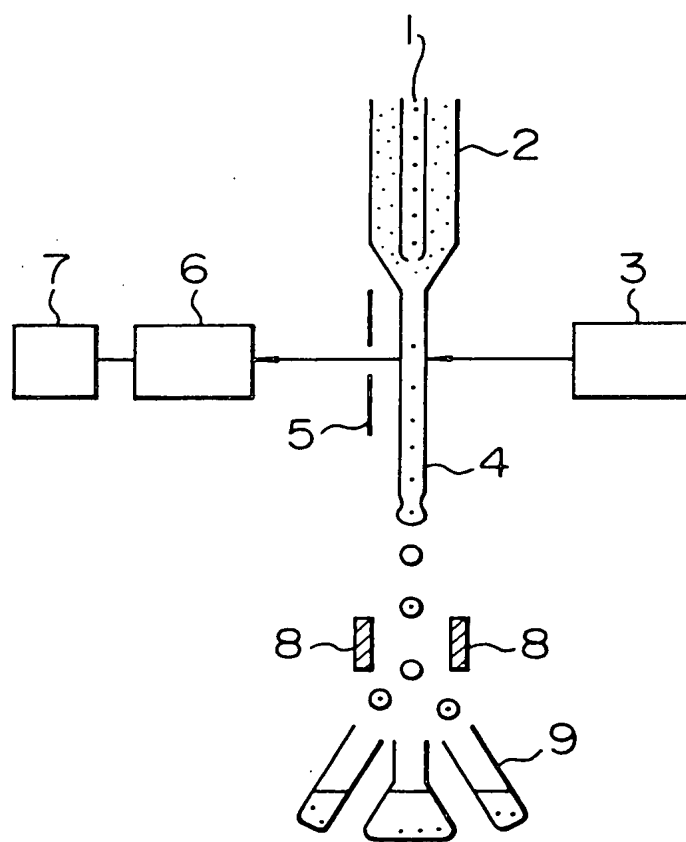
FIG. 2



05.04.88 3

3811566

FIG. 3



DE 3811566 (HITACHI)

The application dates from 1988. The object is to differentiate ("Sortieren") between several types of antigens or cells. It is therefore a question of identifying, not characterising, target cells, e.g. differentiating between groups of cells (including blood platelets). It is a matter of entire populations of cells and not individual cells. Antibodies are employed with known specificity for cell types, while our target antigens are not necessarily specific to target cells, apart from those we use as targets for antibody-coated magnetic microspheres. The use is described of either flow cytometry for identifying/differentiating between different types of blood cells, in a cell suspension or a microscope for examination of smears/cytopreparations. The important thing is that it is not a question of fluoridating microspheres, but microspheres which can be differentiated by means of shape, colour and diameter. It is not characterising of individual cells which may be enriched/selected first. Cells in fluid phase (suspension) are examined by flow, those which are not in fluid phase by microscope on a slide. The microsphere size is preferably 10^{-7} to 10^{-9} metres (range 10^{-10} to 10^{-6}). Old methods are described for determining the number of T or B cells (p.6, 5-12) and the many drawbacks of such methods. It is also mentioned that instead for the old sheep and mouse RBC rosette formation techniques, fluorescence-tagged antibodies (p. 6, 25-30) can be employed directed towards the T or B cells' membrane antigens for "Messung" of the target cell populations, but that this too is a method encumbered with many drawbacks and limitations, including poor expression sensitivity (p. 6, 32-43). Reference is then made to the use of latex particles with fluorescence-tagged antibodies on the surface used for flow cytometry (p. 7, 1-5). Here too problems and limitations are described, including sensitivity, few types of fluorescent colours for labelling, most of them with approximately the same wavelength.

The object of the invention is described (p. 7, 51-57). It is primarily to differentiate between T and B cells, but also other types of cells, such as blood cells, tissue cells, "und dergleiche", or to differentiate between several types of cell antigens. There is nothing to indicate that they have in mind cancer cells or the characterisation thereof. Moreover, the intention is clearly to differentiate between fair-sized groups of cells and not to study a small number of cells among a large population of non-target cells. The proposed method appears to entail the use of non-fluoridating microspheres coupled to antibodies directed towards antibodies which are specifically bound to the

target-cells, i.e. an indirect method, or also a direct method with cell type-specific antibodies bound to the microspheres (p. 8, 17-29). The use of the method is at all times described as "Zellmessung".

The microspheres may be of latex, polyesterol, microcapsules such as liposomes and the like, inorganic substances such as metal particles. The size may be 10^{-10} to 10^{-6} m (= 0.0001 - 1 micrometre), preferably 10^{-7} to 10^{-9} m (0.1 - 0.001 micrometres). The particles should be identified by colour (p.9, 6), size or shape (irrelevant for us). They argue against FITC-labelled antibodies.

The area of application is described (p.10, 2-7), and it is emphasised that the method will be particularly suitable for "Messung" of blood cells (lymphocytes, leukocytes, erythrocytes, blood platelets and the like). Special mention is then made of blood smears or cytopreparations. Cells in suspension are examined with flow cytometry (p.10, 44-45), while we examine cell suspension in a fluorescence microscope. When it is desirable to use colour for identification, it is proposed that unbound particles should be removed, e.g. by spinning (we can use the magnetic microspheres for this).

The figures:

Figure 1: describes the expression of binding of two antibodies bound to microspheres of different colours. These are used on cells on a slide by means of microscopy and spectroscopy.

Figure 2: describes the expression of two types of cells/cell antigens where the cells are on a slide and where the antibody binding is expressed by means of enzymes.

Figure 3: illustrates flow cytometry for analysis of cells in suspension.

The examples:

In all the examples incubation is performed with antibody-coated particles at 37°C. This does not work if it is necessary to have as high a degree of specificity as that demanded by our objectives. In examples 1-3 the microsphere size is 0.03 μm , in example 4 it is 0.8 μm for latex particles and 30 nm for gold particles, while it is not specified in examples 5 and 6. In examples 1 and 2 a blood sample of T and B lymphocytes on a blood smear is examined where the cell is dried and fixed. In example 3 two types of microspheres are employed on lymphocytes in suspension, with incubation

for 1 hour at 37°C. Example 4 is also concerned with analysis of T and B cells in suspension where an extract of the sample is dripped on to a slide where the cells are fixed. In example 5 green and red fluoridating latex particles are employed with anti T and B cell antibody, and the sample is examined by means of a flow cytometer. In example 6 liposomes are employed containing light-absorbing substances, and the analysis is performed with flow.

The claims:

Claim 1: Zellmessung, Sortieren. Antibodies on small particles.

Claim 2: Synthetic polymer substances, microcapsules, inorganic substances, 10^{-10} to 10^{-6} m.

Claim 3: Latex particles

Claim 4: Blood cells

Claim 5: Lymphocytes, leukocytes, erythrocytes and blood platelets.

Claim 6: At least one of the parameters colour, shape and diameter, separated in a microscope.

Claim 7: Blood smears or cytopreparations

Claim 8: Flow cytometry.

Claim 9: Flow, separated by means of shape and/or colour.

Claim 10: In the same sample, differentiate between several types of cells by means of antibodies which are specifically bound to the tested cells, use antibodies which are bound to particles which can be differentiated from one another and which are bound to the primary antibodies.

Claims 11 - 18: Repetition of 2 - 9.

Claims 19 - 29: As for the preceding claims, but direct method.

The following is the same, but now with antigens and not the cells themselves. Then differentiate between types of cells with different antigens.